

**Universidad Pública de Navarra**

***Nafarroako Unibertsitate Publikoa***

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR  
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN  
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKO***

**TRANSFORMACIÓN PLASTIDIAL DE DIFERENTES VARIEDADES DE TABACO**

presentado por

ANDREA SORLI MORENO *k*

*aurkeztua*

INGENIERO TÉCNICO AGRÍCOLA EN HORTOFRUTICULTURA Y JARDINERIA  
*NEKAZARITZAKO INGENIARI TEKNIKO BARATZEZAINZA, FRUTAGINTZA ETA  
LOREZAINZA BEREZITASUNA*

Noviembre, 2010 / 2010, *Azaroa*

# Índice

1.-Resumen .....	3
2.-Introducción .....	4
2.1.-Transformación genética de plantas .....	4
2.2.-Aplicaciones de la transformación plastidial .....	6
2.3.- Transformación plastidial de variedades de tabaco.....	11
3.-Objetivos .....	14
4.-Materiales y métodos. ....	15
4.1.-Material .....	15
4.1.1.-Material vegetal.....	15
4.1.2.- Vector de transformación .....	15
4.2.-Métodos .....	16
4.2.1.-Desinfección de semillas y posterior siembra .....	16
4.2.2.- Preparación de las plántulas para el bombardeo .....	17
4.4.3.- Transformación por el sistema biolístico .....	18
4.4.3.1.- <i>Procedimiento</i> .....	18
4.4.4.- Rondas de selección .....	23
4.4.4.1.- <i>Primera ronda de selección; división de hojas bombardeadas</i> .....	23
4.4.4.2.- <i>Toma de datos</i> .....	23
4.4.4.3.- <i>Segunda ronda de selección</i> .....	24
4.4.4.4.- <i>Tercera ronda de selección</i> .....	24
4.4.5.- Enraizamiento.....	24
4.4.6.-Trasplante y análisis de expresión de la proteína GFP.....	25
4.4.7.- Comprobación de homoplasma por Southern blot.....	26
4.4.8.- Cronograma de la aplicación del trabajo.....	28
5.-Resultados y discusión .....	29
5.1.-Germinación in vitro de las semillas .....	29
5.2.-Obtención de brotes transformados.....	29
5.3.-Enraizamiento.....	34
5.4.-Análisis sobre el grado y porcentaje de transformación en las plantas.....	35
5.4.1.- Expresión de GFP en plantas transplásticas.....	35
5.4.2.- Comprobación de homoplasma mediante Southern Blot.....	37
6.- Conclusiones .....	40
7.- Bibliografía.....	41

## 1.-Resumen

La transformación plastidial en plantas es una de las apuestas más recientes y con mayores expectativas de la investigación. Aunque todavía queda mucho por conocer, constantemente están desarrollándose nuevos métodos y consiguiéndose resultados generalmente provechosos. Intentando optimizar los recursos disponibles se han desarrollado biofactorías de compuestos para la utilización en agricultura y sanidad, que permiten su producción a mayor escala y con menores costes. La especie que mejor se adapta a este proceso es el tabaco y especialmente la variedad Petite Havana. La necesidad de incrementar la producción en biomasa de esta planta, nos ha llevado a buscar en variedades distintas a esta. En el caso de este trabajo han sido seis variedades comerciales de alta producción de biomasa para las que se han evaluado distintos aspectos de la transformación plastidial, dado que casi exclusivamente se utiliza esta por ser la más conocida y por existir mayor información sobre su comportamiento y sus protocolos optimizados.

El método se llevó a cabo mediante transformación biolística con un vector anteriormente utilizado en otras investigaciones pLD-GFP-2L21 con unas características específicas de marcadores de selección *aadA* que confiere resistencia a la espectinomicina y el gen GFP que determina la presencia del vector en el genoma plastidial por medio de luz ultravioleta. Todo el proceso se llevó a cabo con las condiciones específicas para la variedad Petite Havana, sus protocolos y sabiendo de antemano los resultados esperados para ella, lo que permitió compararlos con los resultados de las demás variedades.

Una producción alta en biomasa, la facilidad para su manejo y transformación en laboratorio, la gran cantidad de semillas producidas por una única planta y el aprovechamiento del material vegetal hacen del tabaco una especie particularmente útil en comparación con las dificultades que presentan las demás.



Tutor: Jon Veramendi Charola

## 2.-Introducción

### 2.1.-Transformación genética de plantas

La transformación genética de plantas lleva aplicándose de manera indirecta desde que comenzó su cultivo, ya que, los agricultores seleccionaban las mejores variedades para volver a sembrarlas en las siguientes cosechas mejorando las especies en aspectos de interés humano y separándolas de las silvestres. Más adelante se desarrollaron técnicas de mejora con conocimiento, mediante polinizaciones dirigidas o mutaciones.

Todo esto ha sucedido en los límites de las especies y las variedades, pero la ingeniería genética permite dar un paso adelante saltando las barreras naturales y eligiendo genes de cualquier especie para introducirlos en cualquier otra. La primera vez que se llevó a cabo la transformación genética de un vegetal fue en 1983 con la introducción de un gen de resistencia a kanamicina en plantas de tabaco (Herrera-Estrella *et al.*, 1983), petunia (Fraley *et al.*, 1983), *Nicotiana plumbaginifolia* (Bevan *et al.*, 1983) y la inserción de un gen de alubia en una planta de girasol (Murai *et al.*, 1983), ([http://cls.casa.colostate.edu/cultivostransgenicos/sp\\_history.html](http://cls.casa.colostate.edu/cultivostransgenicos/sp_history.html)).

La biotecnología aplicada a la agricultura tiene una gran utilidad desde sus comienzos. La especie vegetal más utilizada para los fines de investigación es el tabaco.

Algunas de las muchas aplicaciones de la biotecnología y la transformación genética en vegetales, permiten crear plantas capaces de defenderse de enfermedades producidas por virus y bacterias. Modificándoles el material genético adquieren la capacidad de sintetizar ciertas sustancias que interrumpen el desarrollo normal de insectos parásitos y los destruyen. Esto permite reducir la aplicación de plaguicidas químicos, como ocurre en el caso de los genes Cry de *Bacillus thuringiensis* (McBride *et al.*, 1995).

Actualmente uno de los usos más importantes tanto activo como en desarrollo es el uso de plantas transformadas genéticamente como biofactorías para la producción de vacunas como el péptido 2L21 del parvovirus canino (Molina *et al.*, 2004) o la albúmina sérica humana (Fernández-San Millán *et al.*, 2003). La transformación

plastidial tiene mayor importancia en estos aspectos, debido a que el nivel de expresión de la proteína heteróloga es mucho mayor que en la transformación nuclear (Maliga, 2004).

Los plastidios son orgánulos celulares de las plantas con su propio genoma y funcionamiento de transcripción-traducción. Los proplastidios son los progenitores de todos los demás tipos de plastidios como cloroplastos, cromoplastos y amiloplastos, entre otros. La función de los plastidios comprende la biosíntesis de proteínas, azúcares, polisacáridos de reserva, aminoácidos, lípidos y pigmentos y la fotosíntesis. Cada tipo de plastidio tiene copias idénticas de ADN y en el caso del tabaco cada célula meristemática contiene entre 10y14 proplastidios con sus nucleoides (1-2) y cada célula de las hojas contiene unos 100 cloroplastos con 10-14 nucleoides cada uno. (Bendich, 1987; Thomas *et al.*, 1983).

La transformación se lleva a cabo en un número muy bajo de copias de ADN, pero en un medio selectivo se favorece la proliferación de los genomas transformados. El medio selectivo facilita la propagación de los plastidios cuando incorporan un marcador de resistencia a antibiótico (Moll *et al.*, 1990). La transformación se acelera con la dediferenciación de cloroplasto a proplastidio, y los sectores transformados se distinguen por que mantendrán su color verde mientras que los otros blanquearán.

Para conseguir plantas homoplásmicas se lleva a cabo la regeneración de brotes de los sectores transformados inicialmente (Svab *et al.*, 1990; Svab *et al.*, 1993) durante dos rondas de selección y de ser necesario se podría hacer una tercera. En casos en los que haya problemas con la regeneración se pueden utilizar las semillas de las plantas quiméricas para germinarlas y conseguir homoplasmia. No se recomienda hacer muchos ciclos de cultivo in vitro para propagación porque puede afectar en la fertilidad de la planta (Maliga *et al.*, 2004).

Homoplasmia es la presencia de un único tipo de material genético en el genoma de los plastidios. Al llevar a cabo la transformación plastidial puede ocurrir que convivan genomas plastidiales transformados y no transformados (heteroplasmia). Si esto ocurre la planta se considerará transgénica, aunque la tendencia natural, en ausencia de presión de selección, será la proliferación de genomas plastidiales no transformados.

Los vectores para la transformación plastidial son plásmidos con secuencias clonadas de ADN a los que se les introduce el gen deseado, al ser homólogos a los

genes propios del genoma plastidial, estos los identifican como iguales y los transcriben quedando el nuevo gen introducido en los plastidios generados a partir de ese momento.

Entre los métodos de transformación plastidial, el más utilizado es el biolístico. Para llevarlo a cabo se necesita una maquinaria específica, mediante la cual se disparan micropartículas a la planta con la suficiente fuerza como para que entren en las células y dejen el ADN. Los microproyectiles de oro miden 0.6  $\mu\text{m}$  de diámetro y están recubiertos de ADN plasmídico. La fuerza de propulsión es con gas inerte de helio. Los microproyectiles van colocados sobre un macroproyectil de soporte que, tras el disparo, queda retenido en el disco de parada, liberando los microproyectiles para que impacten sobre su diana.

Otro sistema probado en tabaco es un tratamiento de protoplastos con polietilenglicol (PEG) en presencia del vector de transformación, que facilitará el traspaso de moléculas de ADN a los protoplastos (Potrykus *et al.*, 1991).

## ***2.2.-Aplicaciones de la transformación plastidial***

El impulso para investigar rasgos agronómicos por transformación plastidial, dio el hallazgo del gen de resistencia a insectos que confiere la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis*. El nivel de acumulación de la proteína recombinante es relativamente bajo en transformación nuclear, por lo que, se llevo a cabo la transformación del genoma plastidial y los resultados reflejaron un alto nivel de acumulación de la toxina (McBride *et al.*, 1995).

Hasta entonces lo más común era la resistencia a insectos y herbicidas expresados desde el genoma nuclear. Actualmente hay una gran variedad de productos obtenidos por transformación plastidial con aplicaciones biotecnológicas potenciales aunque ningún producto está todavía comercializado (tabla 1).

Rasgo	Transgen	5'3' UTR-s	Referencias
Resistencia a insectos	<i>Cry1A (c)</i>	<i>rbcl/Trps16</i>	McBride <i>et al.</i> , (1995)
Resistencia a herbicidas	<i>AroA</i>	<i>ggagg/TpsbA</i>	Daniell <i>et al.</i> , (1998)
Resistencia a insectos	<i>Cry2Aa2</i>	<i>ggagg(nativo)/ TpsbA</i>	Kota <i>et al.</i> , (1999)
Resistencia a herbicidas	<i>bar</i>	<i>rbcl/psbA</i>	Iamtham and Day, (2000)
Resistencia a insectos	<i>Cry2Aa2</i> operón	5' nativo/UTRs/ <i>TpsbA</i>	DeCosa <i>et al.</i> , (2001)
Resistencia a plagas	<i>MSI-99</i>	<i>ggagg/TpsbA</i>	DeGray <i>et al.</i> , (2001)
Tolerancia a sequía	<i>tps</i>	<i>ggagg/TpsbA</i>	Lee <i>et al.</i> , (2003)
Fitoremediación	<i>merA<sup>a</sup>/merB<sup>b</sup></i>	<i>ggagg<sup>a,b</sup>/TpsbA</i>	Ruiz <i>et al.</i> , (2003)
Tolerancia a salinidad	<i>badh</i>	<i>ggagg/ rps16</i>	Kumar <i>et al.</i> , (2004)
Esterilidad citoplásmica masculina	<i>phaA</i>	<i>PpsbA/TpsbA</i>	Ruiz and Daniell, (2005)

Tabla 1: Tabla procedente de uno de los primeros informes sobre rasgos agronómicos generados vía transformación plastidial. (Daniell *et al.*, 2005).

Uniendo la capacidad de expresar las proteínas en gran medida que tienen los cloroplastos y el espectro de ataque de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*, se halló un importante recurso para el control de plagas en agricultura. Las hojas de las plantas transgénicas que portan la proteína son letales para las larvas de los insectos herbívoros.

La transformación plastidial para el control de malas hierbas se ha explorado sobre todo en la introducción de genes de resistencia al glifosato, siendo éste un herbicida de amplio espectro que al aplicarlo incide sobre todos los vegetales excepto los que contengan el gen. El herbicida actúa inhibiendo la enzima clave de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Algunas bacterias también son una fuente de genes de insensibilidad frente al glifosato, y las mutaciones puntuales en la planta pueden presentar tolerancia a herbicidas. (Daniell *et al.*, 1998).

La capacidad de expresión de proteínas recombinantes de la que disponen los plastidios es relevante para producir vacunas, anticuerpos y enzimas industriales. Las plantas funcionan de forma segura y económica debido que producen a mayor escala que los métodos industriales vía fermentación de bacterias o cultivando células animales y humanas. La producción de proteínas recombinantes está libre de contaminantes procedentes de humanos o animales debido a que las plantas no son huéspedes para

ellos, además los plastidios son capaces de hacer algunas modificaciones post-traduccionales similares a las de células de mamíferos (Daniell H. 2006).

Proteínas	Transgén	3'5'UTR-s	Referencias
Polímero derivado de la elastina	<i>EG121</i>	T7 gene 10/ <i>TpsbA</i>	Guda <i>et al.</i> (2000)
Somatotropina humana	<i>hsT</i>	T7 gene 10 <sup>a</sup> , <i>tpsA<sup>b</sup>/Trps16</i>	Staub <i>et al.</i> (2000)
Toxina del cólera	<i>CtxB</i>	<i>Ggagg/TpsbA</i>	Daniell <i>et al.</i> (2001)
Péptido antimicrobiano	<i>MSI-99</i>	<i>Ggagg/TpsbA</i>	DeGray. <i>et al.</i> (2001)
Interferón $\alpha$ 2b	<i>INFa2B</i>	<i>PpsbA/TpsbA</i>	Chebolu and Daniell (2005)
Albúmina sérica humana	<i>hsa</i>	<i>ggagg<sup>a</sup>, psbA<sup>b</sup> TpsbA</i>	Fernandez-SanMillan <i>et al.</i> (2003)
Interferón $\gamma$	<i>IFN-g</i>	<i>PpsbA/TpsbA</i>	Leelavathi and Reddy (2003)
Anticuerpos monoclonales	<i>Guy's 13; HSVB-Isc</i>	<i>Ggagg/TpsbA</i>	Chebolu and Daniell (2005) Mayfield <i>et al.</i> (2003)
Antígeno protector del Ántrax	<i>Pag</i>	<i>PpsbA/TpsbA</i>	Watson <i>et al.</i> (2004)
CPV VP2	<i>Vp6</i>	<i>rbdL/TrrnB<sup>a</sup></i>	Molina <i>et al.</i> (2004)
Toxina del tétanos	<i>Tet C</i>	T7 gene 10 <sup>a</sup> , <i>atpB<sup>b</sup>/Trbc L</i>	Tregoning <i>et al.</i> (2003)

Tabla 2: Expresión de antígenos para vacunas y proteínas biofarmacéuticas vía genoma plastidial.

Una vez integrados de forma estable, los transgenes expresan grandes cantidades de proteínas (hasta el 47% del total debido al alto número de copias del genoma (más de 10 000 copias/Célula) de los cloroplastos (Daniell 2005; De Cosa *et al.*, 2001; Grevich *et al.*, 2005). Un acre de plantas con cloroplastos transgénicos pueden producir hasta 360 millones de dosis de la vacuna del antígeno de ántrax de forma limpia, segura y completamente funcional (Koya *et al.*, 2005; Watson *et al.*, 2004).

El sistema de expresión de los cloroplastos es versátil en cuanto a la producción de proteínas pudiendo producir péptidos de menos de 20 aminoácidos (DeGray *et al.*, 2001), puede producir proteínas monoméricas o multiméricas (Daniell *et al.*, 2001; Devine, 2001). Actualmente se consiguen proteínas terapéuticas (insulina (Devine, 2005), somatropina (Staub *et al.*., 2000) etc.), antígenos de vacunas contra bacterias patógenas (cólera (Daniell *et al.*, 2001), ántrax (Koya *et al.*, 2005; Watson *et al.*, 2004), tétanos (Tregoning *et al.*, 2003) etc.) y patógenos protozoicos como la malaria (Kamarajugadda, 2006) obtenidas por transformación plastidial. Entre todas las plantas



el tabaco presenta las mejores características para funcionar como biofactoría, debido a su facilidad de manipulación en laboratorio y alta producción de biomasa y semillas (una única planta produce más de un millón de semillas (Daniell, 2006)). (tabla 2).

Las ventajas que presenta la transformación plastidial frente a la nuclear son diversas. Para empezar en la mayoría de especies angiospermas los plastidios se transfieren de generación en generación por herencia materna e incluso en las especies en que existen plastidios en el polen, se degrada el ADN plastidial antes de la maduración, lo que evita por completo el peligro de transmisión de transgenes entre especies sexualmente compatibles (Zhang *et al.*, 2003; Hagemann *et al.*, 2004). También reduce la posible toxicidad del polen transgénico contra insectos de la fauna benigna (DeCosa *et al.*, 2001).

Otra de las ventajas de la transformación plastidial es la posibilidad de acumular en el interior de los cloroplastos cualquier proteína o productos biosintéticos interesantes, y por tanto se pueden utilizar como biofactorías (Bogorad *et al.*, 2000). También se conocen investigaciones llevadas a cabo por transformación nuclear que daban problemas de toxicidad o degradación de la pared celular y al hacerlo por transformación plastidial los resultados han presentado lo esperado inicialmente (Daniell *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003; Leelavathi *et al.*, 2003; Molina *et al.*, 2004).

La integración de transgenes por recombinación homóloga, evita efectos indeseados de posición que se suelen observar en transformación nuclear. Además todas las líneas de cloroplastos transgénicos expresan el mismo nivel de la proteína introducida dentro de la gama de variaciones fisiológicas (Daniell *et al.*, 2001). Otra ventaja de la integración específica es que no se insertan fragmentos de ADN del esqueleto del vector, lo que evita un gran problema de la transformación nuclear (Daniell *et al.*, 2002). No se ha descrito el silenciamiento génico en líneas de cloroplastos transgénicos, aunque su acumulación sea 169 veces mayor que en la transformación nuclear, además tampoco se ha producido silenciamiento cuando la acumulación de la proteína foránea en las hojas transgénicas ha sido mayor al 46% (DeCosa *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003; Dhingra *et al.*, 2004).

Se pueden expresar varios genes bajo el control de un único promotor formando un operón. Esto se ha llevado a cabo con proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* como operón para sintetizar proteínas insecticidas y se expresó en más del 46% de la proteína total de la hoja (DeCosa *et al.*, 2001). También se llevó a cabo con dos enzimas

bacterianas que confieren resistencia al mercurio (Ruiz *et al.*, 2003) y con tres genes bacterianos para la acumulación del polímero PHB (Lossl *et al.*, 2003).

Las limitaciones actuales de la transformación plastidial son las siguientes; En primer lugar está el hecho de que únicamente se ha llevado a cabo de forma eficiente en plantas de tabaco, y los obstáculos para pasar este sistema a cultivos de producción es la falta de protocolos de cultivo y regeneración y la dificultad de producir expresión del transgén en plastidios no fotosintéticos (Bogorad *et al.*, 2000; Daniell *et al.*, 2002).

Algunas de las investigaciones que se han llevado a cabo sobre transformación plastidial por organogénesis no han dado buenos resultados en especies distintas al tabaco. En *Arabidopsis* una de cada 40-151 hojas bombardeadas inicialmente resultó en línea transgénica plastidial, pero eran estériles (Sikdar *et al.*, 1998). En tomate se consiguieron los mejores resultados, siendo una línea transgénica plastidial por cada diez bombardeadas (Ruf *et al.*, 2001) y en patata se obtuvo una única línea modificada por cada veinticinco bombardeadas (Sidorov *et al.*, 1999).

Actualmente se ha llevado a cabo en muchos cultivos comerciales incluyendo soja, algodón y zanahoria.

Una investigación llevada a cabo por (Kumar *et al.*, 2004) sobre la resistencia a suelos salinos mediante la síntesis de betaína aldehído, demostró que se puede trabajar con células no fotosintéticas, ya que, lo realizaron con material vegetal de zanahoria por embriogénesis somática. La expresión en las células no fotosintéticas de la parte comestible fue del 74,8 % y en proplastidios del 53 % frente al 100 % de las células con función fotosintética situadas en las hojas. El interés de la producción transgénica en zanahorias deriva de la valiosa fuente de azúcares, vitaminas y fibra y de su uso tanto en la dieta humana como en la animal. También se considera importante para la expresión de antígenos de vacunas y proteínas por que todos los embriones somáticos de la zanahoria derivan de una única célula y pueden mantenerse *in vitro* varios años, además de que la floración se produce el segundo año del ciclo y la cosecha se lleva a cabo durante el primer ciclo (Yan *et al.*, 1999).

El algodón como cultivo de producción textil es uno de los más importantes comercialmente. La transformación plastidial en este cultivo es necesaria para no

transferir material genético transformado vía polen, y por la baja expresión de los transgenes en transformación nuclear que puede generar resistencias. La investigación llevada a cabo aseguró esa herencia únicamente materna del genoma plastidial (Kumar *et al.*, 2004).

La primera vez que se utilizó la transformación plastidial en soja lo llevó a cabo (Zhang *et al.*, 2001) para incrementar el potencial fotosintético, aunque las primeras plantas transgénicas de soja fértiles fueron obtenidas por Dufourmantel *et al.*, 2004. Otra investigación ha sido llevada a cabo por Daniell *et al.*, 2001 para desechar las limitaciones que produce la necesidad de utilizar un marcador de selección de resistencia a un antibiótico.

### ***2.3.- Transformación plastidial de variedades de tabaco***

Aunque el tabaco es uno de los mejores cultivos para llevar a cabo la transformación plastidial por su facilidad para la manipulación en laboratorio, alta producción de biomasa y semillas y por todos los conocimientos que se tiene de él debido a la gran cantidad de investigaciones que se han llevado a cabo con este cultivo, es necesario dejar a un lado su uso en laboratorio y trasladarlo al ámbito de la producción.

El paso de la investigación a la comercialización de todas las aplicaciones útiles para el tabaco, radica en la producción en biomasa de los vegetales, siendo la variedad Petite Havana que se utiliza en laboratorio de tamaño pequeño y poco productiva 1,395 T/ha en peso fresco, frente a las 50 T/ha de producción que se obtienen en una variedad comercial común (datos no publicados) de biomasa por hectárea que se pueden conseguir en condiciones óptimas con variedades comerciales.

La mayoría de los trabajos realizados en investigación científica para transformación plastidial en variedades de tabaco, se han llevado a cabo sobre la variedad Petite Havana, lo que la convierte en una de las más sencillas de manejar debido a la cantidad de información sobre manipulación y comportamientos que se tiene de ella. Sin embargo se han transformado otras variedades como Maryland Mammoth, Samsun y 22X-1. Los últimos documentos que se han publicado sobre variedades comerciales de tabaco son los siguientes:

La p24 del VIH-1 es una proteína no glicosilada, que purificada confiere algo de protección a la transmisión del virus. Su multiplicación se ha llevado a cabo mediante transformación nuclear y transfección viral, aunque en las dos existe el peligro de escape de genes. La transformación plastidial es una buena opción para evitar esto, además las obtenidas de este modo no estarán glicosiladas ni se transmitirán por el polen. Maryland Mammoth es una variedad de alta producción en biomasa, lo que favorecerá la producción del antígeno. La transformación plastidial se llevó a cabo con los mismos protocolos de la variedad Petite Havana. La frecuencia de transformación de los bombardeos de hojas organogénicas con esta variedad, fue similar a la obtenida con la variedad Petite Havana, pero los bombardeos en hojas a partir de semillas no produjeron brotes transformados. (Mc Cabe *et al.*, 2008).

La fermentación de la glucosa para obtener etanol como biofuel a partir de la celulosa es un proyecto en investigación. La forma de obtener glucosa en grandes cantidades es a partir de la celulosa, y para degradarla hacen falta celulasas.

Con la variedad Samsun se llevó a cabo una investigación sobre el alto nivel de acumulación de la celulasa bacteriana en tabaco por transformación plastidial. Hasta entonces se producía el etanol celulósico con celulasas cuyo coste era muy alto. Para reducir el coste se propuso utilizar cloroplastos como medio para la producción de las enzimas. Las diferencias en el bombardeo con el protocolo utilizado en la variedad Petite Havana son insignificantes, las plantas obtenidas a partir del bombardeo se evaluaron directamente con PCR para seleccionar las transformadas y después se hicieron las rondas de selección para conseguir homoplasma. (Gray *et al.*, 2009).

22X-1 es una variedad derivada de la K327 creada como variedad “sin nicotina”. En esta investigación se ha observado la expresión de una celulasa microbial termoestable en los cloroplastos transgénicos de la variedad. Al no tener evaluaciones previas sobre el comportamiento en bombardeo para esta variedad, tuvieron que hacer un ensayo sobre el material de disparos, siendo oro el que mejores resultados dio frente al tungsteno. La variedad 22X-1 presentó algunas mejoras frente a las variedades habituales como Petite Havana y Samsun; mayor biomasa foliar y que al ser sin nicotina no produce niveles tóxicos de nicotina en los extractos de las hojas, y que la biomasa residual puede ser utilizada como materia prima para la formación de bioetanol como

combustible. La eficiencia de regeneración fue del 2% (número de brotes por hoja) para samsung y 22x-1 en los bombardeos con oro. Las hojas bombardeadas se cortaron en dos fragmentos por hoja.(Yu *et al.*, 2007).

### **3.-Objetivos**

- 1.- Evaluación de la transformación plastidial de seis variedades comerciales de tabaco: Hanica, ITB 1000, Virginia Gold, Havana 503-B, K 326, Baja en nicotina.
- 2.- Comparación de los resultados (brotes transformados, enraizamiento, homoplasma, expresión del transgén y comportamiento durante la investigación) en las variedades comerciales con la variedad control Petite Havana, para la cual se dispone de un protocolo optimizado de transformación plastidial.

## 4.-Materiales y métodos.

### 4.1.-Material

#### 4.1.1.-Material vegetal

Se dispone de seis variedades de tabaco (tabla 3) además de otra que utilizaremos a modo de control (Petite Havana), debido a que es la más utilizada en investigación sobre transformación plastidial.

Variedad	Abreviatura
Hanica	HAN
K 326	326
ITB 1000	ITB
Havana 503-B	503
Virginia Gold	VIR
Baja en nicotina	BAJA
Petite Havana (control)	PH

Tabla 3: Variedades de tabaco utilizadas durante todo el proceso y abreviaturas correspondientes a cada una de ellas con las que se les denominará en el escrito con el fin de facilitar la relación de los términos.

La totalidad de las variedades están disponibles en el laboratorio, en forma de semillas.

Se dispuso de lo necesario para llevar a cabo el proyecto, en las instalaciones del Instituto de Agrobiotecnología de la Universidad Pública de Navarra, por lo que todo el material y la maquinaria necesarios estuvieron fácilmente al alcance, en la medida de las necesidades.

#### 4.1.2.- Vector de transformación

Se utilizó el vector pLD-GFP-2L21 ya empleado en trabajos anteriores (Molina *et al.*, 2004). Este está formado por las siguientes partes:

- a)- Secuencias externas *trnI* y *trnA* para la recombinación homóloga en las regiones invertidas repetidas al genoma del cloroplasto.
- b)- La fusión *GFP-2L21* está controlada por el promotor y terminador del gen plastidial *psbA*.
- c)- Gen marcador de selección *aadA*

La utilización del gen *GFP* informador permite la visualización, en condiciones específicas, del grado de transformación de las plantas.

## **4.2.-Métodos**

### **4.2.1.-Desinfección de semillas y posterior siembra**

Para comenzar el trabajo, se escogieron las variedades con las que trabajar. El criterio principal fue su buena aptitud para multiplicarse in vitro por organogénesis. Esto se observó en un trabajo previo (Villabona, 2006) las semillas provienen de cultivo convencional en campo, por lo que pueden contener bacterias, hongos, y otros problemas derivados de su contacto con la tierra.

Para evitar esto en la medida de lo posible, se hizo una primera desinfección de las semillas mediante un protocolo preparado para la variedad Petite Havana:

#### **Material necesario:**

Lejía, comercial (4% de cloro activo)  
Tween-20  
Pipeta de 1000  
Caja de puntas azules estéril  
Caja de puntas azules cortadas estéril  
Agua purificada  
Vaso de precipitados  
Medio de germinación P3\*  
Cinta micropore

#### **Protocolo:**

- Preparar lejía diluida con agua purificada en relación 1:4 y añadir 5 Tween20/100 ml.
- Poner las semillas en un eppendorf y añadir 1 ml de la solución desinfectante.
- Dejar en agitación durante 20 min.
- En la cabina de flujo laminar lavar las semillas seis veces con 1 ml de agua estéril.
- Tras el último lavado, añadir 0,5 ml de agua estéril. Recoger las semillas con la punta de la pipeta cortada y echarlas en el medio de regeneración P3.
- Sellar las cajas de medio con cinta micropore.



La siembra de las semillas, una vez desinfectadas, se hizo mediante una micropipeta de 1000 µl con la punta cortada, cogiéndolas a la vez que el agua estéril con la que se hizo el último lavado. De esta manera la dispersión en el medio de cultivo es más sencilla. El medio de cultivo utilizado fue P3 para la germinación, en botes estériles de cultivo.

**\*Protocolo para el medio de cultivo P3:**

- Agua purificada.
- Sales minerales y vitaminas de Murashige&Skoog (Duchefa).
- 30 gr/l de sacarosa comercial.
- Disolver y llevar a pH 5,7-5,8 con KOH o ClH.
- Añadir 6 gr/l de micro agar y calentar en el microondas hasta que hierva y se funda.
- Dispensar en cajas Magenta (aproximadamente 40 ml por caja) y autoclavar 15 min a 121 °C.

**4.2.2.- Preparación de las plántulas para el bombardeo**

En el plazo de dos a tres semanas, germinaron las semillas sembradas. Dada la cantidad de semillas puestas, fue necesario individualizar las plántulas en la mayoría de las variedades para evitar competencias de espacio en los botes y nutrientes del medio. Para las variedades ITB y HAN el crecimiento fue más lento por lo que se esperó a la tercera semana para mantener la uniformidad de las fechas.

La individualización se hizo en botes de cultivo con el mismo medio P3 poniendo tres plántulas por bote con la idea de permitir un mayor crecimiento.

Cuando crecieron lo suficiente se individualizaron de nuevo poniendo esta vez 1 brote/recipiente. Esta maniobra permitió aumentar el crecimiento de las plantas hasta la totalidad del volumen del bote con la finalidad de obtener hojas suficientemente grandes y sanas como para llevar a cabo la siguiente fase del trabajo.

### 4.4.3.- Transformación por el sistema biolístico

Esta fase fue la más compleja del trabajo, debido a que hay que disponer de material y maquinaria especializados para llevarla a cabo.

#### 4.4.3.1.- Procedimiento

Se eligieron las hojas sobre las que se llevaría a cabo el bombardeo, escogiendo las más expandidas y con color verde oscuro más intenso, lo que denota salud. Después se cortaron de la planta de la que provenían mediante pinzas y bisturí en cabina de flujo laminar garantizando en la medida de lo posible las condiciones estériles. Para ponerlas en medio de cultivo RMOP sin antibiótico, se situó entre ellas y dicho medio un papel de filtro previamente esterilizado en el autoclave.

Después de llevar a cabo este paso, se guardaron en cámara a temperatura ambiente durante al menos una hora en condiciones de oscuridad, cubriéndolas mediante papel de aluminio. Para facilitar su introducción en el cañón de genes, se pusieron en placas Petri estándar.

#### Preparación de medio RMOPspec

Añadir:

- Sales minerales Murashige&Skoog sin vitaminas (Duchefa). Indica en el bote la cantidad a aplicar por litro de medio.
- 30 gr/l de sacarosa Sigma.
- Agua purificada.
- MyoInositol 100 mg/l en polvo.
- BAP líquido (Sigma B-3274) 1 ml/l de medio del stock a 1 mg/ml.
- ANA líquido (Sigma N-1641) 100 µl por litro de medio del stock a 1 mg/ml.
- Tiamina HCl líquida 1 ml/l de medio del stock a 1 mg/ml en polvo.

Ajustar el pH a 5,7-5,8 con KOH.

Enrasar al volumen final.

Poner 500 ml en botellas de 1l y añadir 3 gramos de phytagar (Gibco, 10675-023).

Precalentar el autoclave y poner la botella cuando esté caliente.

Autoclavar a 121 °C durante 15 min.

Sacar y enfriar las botellas rápidamente con agua hasta que se pueda añadir el antibiótico.

Añadir en cabina de flujo laminar, 2,5 ml de espectinomicina (100 mg/ml, esterilizada por filtración y guardada a -20 °C) por cada medio litro de medio.

Agitar y dispensar en cajas Magenta GA-7 (Sigma, V-8505) a razón de 40 ml por caja.

### **PREPARACIÓN DEL ORO (100 hojas a 500 µg/bombardeo)**

#### **Material necesario:**

- Micropartículas de oro 0,6 micras, 50 mg (Biorad, 165-2262).
- Etanol recién preparado diluido al 70 %.
- Agua purificada.
- Glicerol estéril por filtración al 50 %.

1. Pesar 50 mg de micropartículas en un eppendorf de 1,5 ml.
2. Añadir 1 ml de EtOH al 70 % recién preparado.
3. Agitar en un Vortex a temperatura ambiente durante 3-5 min.
4. Incubar a temperatura ambiente durante 15 min.
5. Centrifugar las micropartículas de oro durante 20 segundos a 3000 rpm.
6. Descartar el sobrenadante.
7. Repetir tres veces los siguientes pasos:
  - a. Añadir 1 ml de agua estéril.
  - b. Agitar en el Vortex durante 1 min.
  - c. Centrifugar las micropartículas durante 1 min a 3000 rpm.
  - d. Descartar el sobrenadante.
8. Añadir 833 µl de glicerol estéril por filtración al 50 % y agitar en el Vortex.
9. Guardar a temperatura ambiente hasta 2 semanas o a -20 °C durante más de un año.

El proceso se realiza en la poyata, no son necesarias las condiciones estériles. Esta cantidad de oro permite hacer unos 100 disparos.

### **PREPARACIÓN DEL FUNGIBLE DE LA PISTOLA**

Macroproyectil (Biorad, 165-2335) y discos de ruptura 1100 psi (Biorad, 165-2329), (láminas marrones transparentes).

Agitarlas bien en un vaso de precipitados con agua estéril.

Pasarlas con pinzas a un tubo tipo falcon con EtOH al 70 %

Incubar 15 min agitando de vez en cuando con el Vortex.

Sacarlas en la cabina y dejarlas sobre papel estéril.

Disco de parada (Biorad, 165-2336)

Se esterilizan en el autoclave en botella de vidrio con tapón de rosca.

Porta macroproyectiles metálicos (Biorad, 165-2322)

Se esterilizan en el autoclave (durante su uso en la cabina se desinfectan por inmersión en EtOH 70 %)

## PREPARACIÓN DE LOS PROYECTILES

Material necesario:

DNA de miniprep (kit de Qiagen) en hielo

CaCl<sub>2</sub> 2,5 M fresco (máx 3-4 días a 4 °C) esterilizado por filtración en hielo. No congelar.

Espermidina 0,1 M esterilizada por filtración en hielo. Pesar 1 gr, añadir 6,8 ml de agua, filtrar y guardar en alícuotas de 25 µl a -20 °C

Partículas de oro

Etanol a 99,5 %

1. Agitar mediante Vortex el oro y recoger 50 µl (unos 3 mg de oro) en un tubo eppendorf (permite hacer 5 disparos)
2. Añadir 1500 ng DNA en un máximo de 10 µl de la miniprep (si está muy concentrado usar menos, debe aparecer una banda clara en un gel cargando 2 µl), equivale a unos 600 ng de oro. Agitar con Vortex
3. Añadir 50 µl de CaCl<sub>2</sub>, Agitar con Vortex
4. Añadir 20 µl de espermidina, Agitar con Vortex
  5. Agitar el tubo a 4 °C durante 20 min en el Termomixer
6. Repetir este paso 5 veces:
  - a. Añadir 200 µl de EtOH 99,5 %, Agitar con Vortex
  - b. Centrifugar 30 segundos a 3000 rpm
  - c. Quitar con la pipeta todo el EtOH posible
7. Resuspender en 30 µl de EtOH 99,5 % agitar con Vortex.

Es importante mantener el orden en que se añaden los productos. El proceso se realiza en la poyata, no son necesarias condiciones estériles.

## **BOMBARDEOS**

Llevar a la cabina los proyectiles preparados en hielo y un agitador de tipo Vortex. Una vez preparados los proyectiles, no dejar pasar más de dos horas hasta el bombardeo.

### **Material vegetal:**

Se coloca un papel de filtro estéril sobre placas RMOP sin antibiótico.

Se corta una hoja y se pone el haz en contacto con el filtro. Deben separarse aproximadamente una hora antes de comenzar el bombardeo.

Poner una hoja control sin bombardear.

Lavar todas las piezas del cañón de genes con etanol: la cámara, las piezas y el plástico rojo (ajusta los macroproyectiles sobre el porta-macroproyectil).

Sacar los porta-macroproyectiles metálicos (Biorad, 165-2322) y colocarlos con la superficie plana en contacto con la superficie de trabajo.

Colocar con pinzas el macroproyectil (Biorad, 265-2335, lámina grande transparente) encima del porta- macroproyectiles y ajustarlo con el plástico rojo.

Añadir 5  $\mu$ l del oro recubierto de DNA, previamente agitado con Vortex, en la parte central de la lámina y repartirlo por toda la zona central (corresponde a 420  $\mu$ g de oro).

Abrir la válvula de la bombona de helio hasta el final.

Girar la válvula del manómetro de salida a la derecha hasta 1350 psi.

Encender la bomba que está debajo de la cabina.

Poner el “*vacum flow rate*” en #5 en la parte superior del tube y el “*vent flow rate*” en #3.

Colocar en la cámara superior roscada un disco de ruptura de 1100 psi (Biorad, 165-2329) y enroscarla en su sitio.

Retirar la bandeja de teflón, quitar la tapa, poner una disco de parada (Biorad, 165-2336, rejilla metálica), el conjunto porta- macroproyectil colocando el DNA sobre la malla, poner la tapa roscada y colocarlo en su sitio.

Colocar el soporte de la placa dejando dos rendijas libres.

### **Para realizar un disparo:**

- 1.-Meter la placa con la hoja
- 2.-Cerrar la puerta
- 3.-Presionar el botón de la izquierda para conectar el cañón, después al del medio (vac) hacia arriba hasta que la presión llegue a 28 in Hg vac en este momento poner el botón en su posición inferior (hold)
- 4.-Presionar el botón a la derecha (fire).
- 5.-Cuando el manómetro marca 1100 psi se rompe el disco de ruptura, se oirá un ruido y se suelta el botón fire.
- 6.-Colocar el botón del medio en su posición media (vent)
- 7.-Cuando la presión haya bajado a 0, se puede abrir la puerta, sacar todo y preparar el siguiente disparo.

Tras el disparo se sellan las placas con parafilm y se envuelven en papel de aluminio para que estén dos días en oscuridad a 28 °C.

### **Cuando se terminan los disparos:**

Cerrar la válvula de la bombona.

Hacer el vacío presionando el botón vac hasta 25 in Hg vac aproximadamente, ponerlo en hold y darle a fire hasta que baje la presión de los dos manómetros de la bombona de helio, ponerlo entonces en vent.

Girar la válvula del manómetro hasta que quede floja.

Apagar la bomba.

Apagar la máquina del botón de la izquierda.

Dos días después del bombardeo se quitó el nervio central de las hojas, se cortaron en fragmentos de 5x5 mm y se puso el envés, zona bombardeada, en contacto con el medio RMOP con 500 mg/l de espectinomicina. Se sellaron las cajas Magenta con parafilm.

Fue conveniente tener al menos 40 ml de medio por caja ya que no se realizarían subcultivos y debía aguantar todo el período de cultivo en ese medio.

Se colocaron de 5 a 6 fragmentos de hoja por caja.

Se bombardearon para cada variedad de tabaco a investigar, una cantidad de 10 placas, es decir, diez hojas, además de una que se dejó sin bombardear como control de regeneración de cada variedad. En el caso de la variedad control PH únicamente se bombardearon cinco hojas

#### **4.4.4.- Rondas de selección**

##### ***4.4.4.1.-Primera ronda de selección; división de hojas bombardeadas***

Al finalizar los bombardeos había diez hojas bombardeadas de cada una de las variedades, lo que sumaron 55 disparos llevados a cabo. Teniendo en cuenta que con cada una de las hojas se llenaron cuatro cajas Magenta con la idea de obtener más sitio para que se desarrollaran estos fragmentos de hoja y con ellos los regenerantes transgénicos, el número de cajas Magenta con el que se trabajó fue de 232 incluyendo las que contenían hojas control.

Cada una de las hojas se troceó en condiciones estériles en cabina de flujo laminar mediante bisturí y pinzas también estériles. Se llevó a cabo en el menor tiempo posible, ya que, las hojas se deshidratan con rapidez.

Se hicieron en la medida de lo posible dieciséis trozos para situarlos de cuatro en cuatro en las cajas Magenta, con el fin de conseguir espacio y contacto con el medio suficientes como para que se desarrollaran los regenerantes de la manera más eficiente posible. Finalmente disponíamos de 232 cajas Magenta con cuatro pedazos de hoja cada una. De las cuales doce eran cajas control; una de RMOPspec y otra de RMOP sin espectinomycin correspondientes a las seis variedades utilizadas.

##### ***4.4.4.2.-Toma de datos***

A partir de la fase de división de las hojas en cajas Magenta, comenzó el conteo de cajas y número de regenerantes por hoja y variedad. Esta práctica sirvió para llevar un control riguroso sobre la capacidad de regeneración de cada una de las variedades y con ello obtener un resultado con el que tomar decisiones en otros trabajos.

La toma de datos se hizo semanalmente mediante el conteo del número de regenerantes por caja y el número de contaminaciones por hoja. Para ello se utilizaron unos estadillos divididos en 10 semanas con 10 hojas por variedad.

Los regenerantes comenzaron a aparecer a partir de la cuarta semana, en concordancia con las pautas de la variedad control “Petite Havana” PH.

#### ***4.4.4.3.- Segunda ronda de selección***

Durante la primera ronda es fácil que no se produzca homoplasma en las células, por lo que se llevó a cabo una segunda ronda para asegurarla, ya que el contacto con el medio con espectinomicina favorece este proceso. En esta se obtuvo la homoplasma esperada.

#### ***4.4.4.4.-Tercera ronda de selección***

El procedimiento es parecido a los anteriores, con la diferencia de que las hojas cogidas son de muy pequeño tamaño y son las hojas más bajas de las plántulas que se pasan a enraizar.

Se hizo para poder mantener el material vegetal, y ganar tiempo, por si no se conseguía la homoplasma tras dos rondas de selección.

#### **4.4.5.- Enraizamiento**

Paralelamente a la tercera ronda de selección y con material de la misma procedencia que el utilizado en la misma, se procedió al enraizamiento. Esta es la última fase de regeneración y mantenimiento de las plantas. Fue en este momento donde se determinó la capacidad de crecimiento de cada una de las variedades. Se cogieron diez brotes de cada, y se subcultivaron en medio P3 con espectinomicina, para el enraizamiento, en tres cajas Magenta por variedad.

#### **Protocolo para medio P3 spec:**

- Sales de Murashige&Skoog (Duchefa). [39,6 gr/10 l].
- 30 gr/l de sacarosa comercial.
- Disolver y llevar a pH 5,7-5,8 con KOH o ClH.
- Añadir 6 gr/l de micro agar y calentar en el microondas hasta que hierva y se funda.
- Autoclavar 15 min a 121 °C.
- Tras autoclavar esperar a que el medio se enfríe hasta unos sesenta grados.  
Añadir en cabina de flujo laminar 5 ml de espectinomicina por cada medio litro, del stock a 100 mg/ml.



- Agitar y dispensar en cajas Magenta previamente autoclavadas a unos 40 ml por caja.

El medio P3 está especialmente diseñado para facilitar el enraizamiento de los brotes. Estas plantas se dejaron alrededor de dos semanas en el medio y para entonces su tamaño había aumentado y tenían raíces funcionales suficientes como para proceder al trasplante.

Se hicieron conteos sobre el número de plantas enraizadas al pasar a trasplante con relación al número de plantas inicial, para obtener porcentajes de enraizamiento según las variedades.

#### **4.4.6.-Trasplante y análisis de expresión de la proteína GFP**

Para llevar a cabo esta fase es imprescindible que la anterior se haya producido de manera correcta, es decir que la mayoría de las plantas pasadas a enraizar tengan raíces suficientes como para sobrevivir fuera de un medio de cultivo. En este caso el medio al que se trasplantaron fue una mezcla de turba y perlita en relación 4:1 respectivamente.

Disponiendo de diez plántulas de cada variedad en cajas Magenta con medio de cultivo P3 con espectinomicina en las que desarrollaron sus raíces, en este momento estaban preparadas para pasar a tierra. Los recipientes en los que situamos el material fueron dos bandejas de 50 cm de largo x30 cm de ancho, que disponiendo una encima de la otra, la superior tiene unos agujeros por los que deja salir el agua, y la inferior la recoge. En el interior de las mismas pusimos “jiffys” individuales para cada una de las plantas. Se procuró dejar una fila de “jiffys” vacíos en los extremos que quedaron al aire para evitar la muerte por desecación y mantener las mismas condiciones para todas las plantas. Se cubrieron con una tapa transparente para mantener una alta humedad relativa.

Para analizar la expresión de la GFP se utilizó luz ultravioleta en condiciones de oscuridad en una habitación acondicionada para ello.

Este gen GFP bajo luz ultravioleta, emite fluorescencia verde clara, por lo que las plantas que disponían de él en el genoma de sus plastidios emitieron esa luz, mientras que las demás emitieron luz granate propia de la clorofila.

#### 4.4.7.- Comprobación de homoplasma por Southern blot

Es el método de biología molecular que permite detectar la presencia de una secuencia de ADN en una mezcla compleja de ácidos nucleicos. Para ello, se emplea la técnica de electroforesis en gel de agarosa con el fin de separar en base a la longitud de los fragmentos de ADN y, después, una transferencia a una membrana en la cual se efectúa la hibridación de la sonda. Su nombre procede del apellido de su inventor, un biólogo inglés llamado Edwin Southern.

Este proceso se llevó a cabo mediante ocho pasos.

El primero de los pasos fue la digestión del ADN. Para ello inicialmente se extrajo del material vegetal del que se disponía (10 µg). Esto se llevó a cabo mediante el protocolo de CTAB y se cuantificó. Después se procedió a la digestión mediante la enzima *EcoRI*. Estas tuvieron doble función, porque además de digerir el ADN para poder utilizarlo en la comprobación, permitió generar una respuesta diferente para las células transformadas y las no transformadas. La digestión se hizo añadiendo 3 µl de la enzima por la mañana, la tarde y la noche, y después se llevó a 300 µl con agua purificada y se situó en un gel de 2 % agarosa/formaldehído.

Tras la separación de los fragmentos por tamaño se realizó la desnaturalización del ADN en el gel de agarosa.

El siguiente paso se llevó a cabo en un agitador. Se depurinó mediante inmersión en 0,2 N HCl durante 10 min. para permitir la fragmentación del ADN, y se hizo un lavado de 5 min. con agua. Después se desnaturalizó (se pasa de doble cadena a simple) para poder unirse a la sonda, se incubó 45 min. y se procedió a otro lavado de 5 min. con agua. Finalmente se neutralizó sumergiéndolo en una solución 1 M tris HCl pH 7.4, 1.5 M NaCl durante 30 min. y se renovó para volver a sumergirlo durante 15 min. más.

La siguiente fase fue para pasar la solución de ADN del gel en el que se situaba a una membrana de nylon. Para ello se necesitó una solución de transferencia en la que se incubó el gel durante 5-10 min.. Mediante papeles y servilletas se llevó poco a poco la solución al gel, y se eliminaron las burbujas con un rodillo de cristal. Al desmontarlo se marcó la zona en la que la membrana quedó pegada a los pocillos de gel para tomarla como referencia. Después cogiendo la membrana en la que se quedó el ADN se fijó con UV en el Stratalinker. Para guardar la membrana se situó entre dos papeles de filtro en una bolsa de plástico a -20 °C y en oscuridad.

Tanto la preparación de la sonda como la detección o revelado se realizaron mediante el kit de Amersham Biosciences *AlkPhos*. Se diluyeron 10 µl de la solución de *Cross-linker* en 40 de H<sub>2</sub>O. El ADN que constituiría la sonda y se diluyeron a 10ng/µl. Se pusieron 30 µl del ADN diluido a desnaturalizar en ~~uno de~~ agua hirviendo durante 5 min. Se dejó enfriar, se centrifugó y se le añadieron 30 µl del tampón de reacción y 6 µl del reactivo *Labelling* mezclándolos bien. Se añadieron 30 µl de la solución *Cross-linker*, se le dio un pulso de centrifuga y finalmente se incubó la reacción 30 min a 37 ° C.

El quinto de los pasos de este protocolo, fue la hibridación de la membrana. Para ello se utilizó una máquina llamada Mini Oven de *Hybaid*. La membrana debía introducirse enrollada dejando el ADN en el interior. Primero se incubaron 30ml del tampón de prehibridación durante 4 h a 55 °C, después se añadió la sonda al tampón de prehibridación. Se dejó durante una noche entera girando a 55 °C.

Para el lavado de la membrana hubo que subir la temperatura del Mini Oven hasta 60 °C y se rellenó el cilindro con el *tampón primario de limpieza* durante 10 min. Este proceso se repitió dos veces descartando el tampón. Después se utilizó el *tampón secundario de limpieza* de la misma manera durante 5 min a temperatura ambiente (RT), habiendo sacado la membrana del Mini Oven. Este proceso también se repitió, descartando el tampón.

Como siguiente paso estaba el revelado de la membrana. Para ello se puso con el lado que contenía el ADN hacia arriba, se le añadieron 4 ml del reactivo CDP-star del kit *Alkphos* de Amersham Biosciences. Se incubó durante 3-4 min moviendo el papel de aluminio para asegurar que toda la membrana se ponía en contacto con el CDP-star, se recortó un trozo de film plástico dejando forradas las dos caras de la membrana y se pasó un papel para eliminar las posibles burbujas de aire. Se colocó en el cassette de revelado, se colocaron las películas de Hyperfilm de Amersham y se dejó incubar en oscuridad al menos durante media hora, luego se reveló la película.

El último de los pasos fue el lavado de la membrana ya que se puede reutilizar. Esto se hizo en una estufa a 60 °C añadiéndole 200 ml de SDS al 5 %. Se aclaró, se envolvió y se guardó en el congelador.

#### 4.4.8.- Cronograma de la aplicación del trabajo

El procedimiento a seguir estaba planificado en nueve pautas que en total duraron alrededor de treinta y seis semanas (tabla 4). Para seguir esta planificación fue importante mantener el crecimiento de las variedades lo más uniforme en el tiempo posible, teniendo en cuenta las limitaciones por diferencias genéticas y otros factores.

<b>Semana</b>	<b>Tarea</b>
<b>0</b>	Desinfección y siembra de semillas
<b>2</b>	Individualizar plántulas
<b>6</b>	Cortar los brotes y subcultivar
<b>10</b>	Bombardeo
<b>20</b>	Obtención de regenerantes
<b>24</b>	Segunda ronda de selección
<b>28</b>	Tercera ronda de selección
<b>32</b>	Enraizamiento
<b>36</b>	Trasplante y análisis de las plantas

Tabla 4: Cronograma de cada fase del trabajo, divididas en semanas según su duración estimada para la variedad control Petite Havana, y las tareas respectivas para cada una de ellas.

## **5.-Resultados y discusión**

### ***5.1.-Germinación in vitro de las semillas***

Las variedades 326, ITB, 503 y VIR germinaron normalmente, no presentaron contaminación y desarrollaron plantas normalmente. Sin embargo, las variedades HAN e ITB sufrieron contaminaciones, probablemente de origen bacteriano, durante el crecimiento inicial a partir de las semillas puestas a germinar en medio de cultivo. Este problema pudo deberse a la procedencia de campo de las semillas de partida. Para combatir esta bacteria se hizo una segunda desinfección a base de etanol al 70 % antes del tratamiento con CIONa, este método sirvió únicamente para la variedad ITB que continuó con todo el proceso de transformación y no volvió a presentar síntomas de contaminación. La variedad HAN en cambio, siguió sufriendo la incidencia de la bacteria dándose los síntomas sobre todo en plántulas de más de 3 semanas. Este problema obligó a eliminar la variedad del estudio ya que se hizo imposible trabajar con ella.

Las variedades ITB y BAJA presentaron un crecimiento más lento que el resto de las variedades y que la variedad control Petite Havana, sobre todo en las primeras fases de individualización antes del bombardeo. Debido a esto se tuvo que posponer su bombardeo dos semanas respecto a las otras.

### ***5.2.-Obtención de brotes transformados***

Se bombardearon hojas bien desarrolladas y de color verde oscuro con el cañón de genes utilizando el vector pLD-GFP-2L21. Se cortaron las hojas en fragmentos de 5 x5 mm y se cultivaron en medio RMOP con espectinomicina como agente de selección para regenerar yemas a partir de las células transformadas.

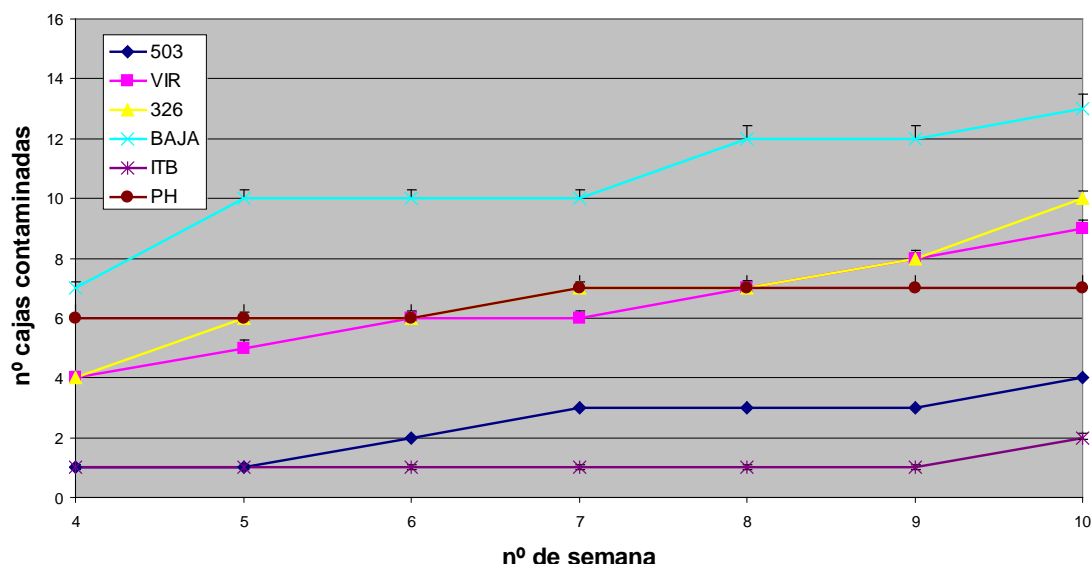


Figura nº1. Contaminación durante la primera ronda de selección. (n=40 cajas Magenta/variedad).

El porcentaje de contaminaciones en todas las variedades fue como mucho del 30 % aunque la mayoría rondó entre el 15 y el 25 % (figura 1). Estas se debieron principalmente a la aparición de hongos sobre el medio de cultivo debido al manipulador. Las diferencias entre variedades no se deben a ningún factor específico. No se consideran porcentajes altos, ya que, únicamente una supera el 25 % y la cantidad de material con la que se trabajó fue alta; cada variedad dispone de 40 cajas Magenta con su material vegetal, teniendo en total 232 cajas contando las control.

La toma de datos de formación de yemas comenzó a partir de la cuarta semana de crecimiento para cada una de las variedades, en la cual ya se registraron grandes cantidades de yemas regeneradas que la semana anterior únicamente comenzaban a emerger (figura 2). Mientras que en las variedades más precoces como 503 y PH se observó una media de entre 2y 2,5 yemas por hoja transformada, en el resto (VIR, 326 e ITB) variaba entre 1 y 1,5 . La variedad más tardía y con más dificultades para formar regenerantes fue la BAJA que en la cuarta semana presentó 0 yemas por hoja.

Durante las siguientes semanas la cantidad de regenerantes aumentó según lo previsto para la variedad control Petite Havana, exceptuando el caso de BAJA que progresó de forma muy reducida en un intervalo de tiempo muy largo.

En lo referente a las hojas control no bombardeadas, las expectativas se cumplieron para todas las variedades. Los fragmentos de hoja situados en medio de cultivo RMOP sin espectinomycinina se desarrollaron más rápidamente que la totalidad de las cajas en todas

las variedades. Los fragmentos de hoja situados en el medio de cultivo RMOP con el antibiótico espectinomicina, durante las primeras semanas se comportaron como la totalidad de los trozos de hoja tomando tonos blanquecinos, con la diferencia de que ninguno de los explantos formó yemas, por lo que al poco tiempo se produjo la muerte de todos los trozos en todas las variedades.

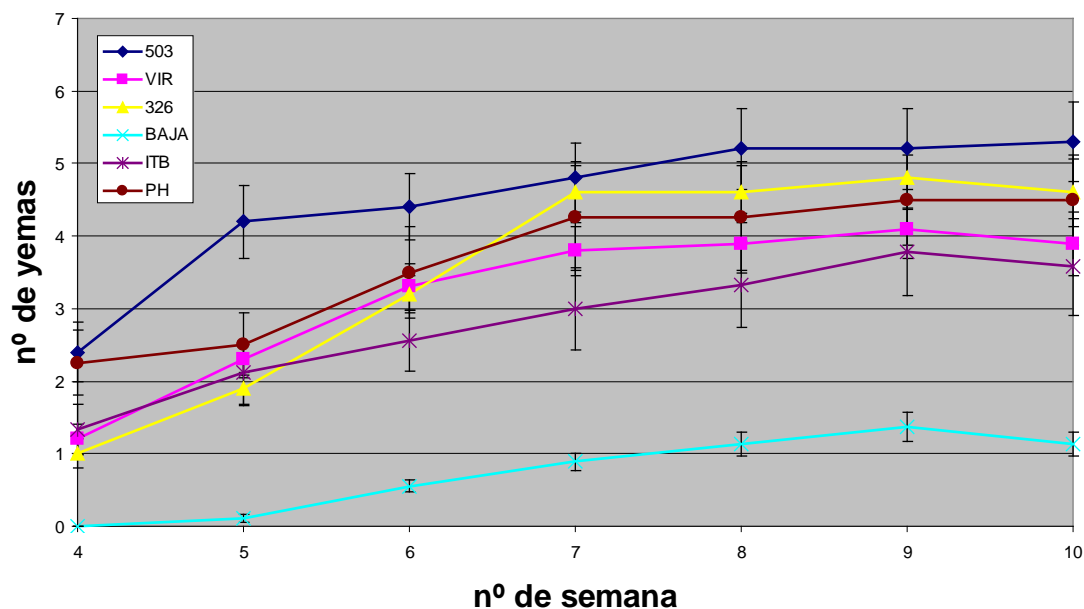


Figura nº2: nº de yemas formadas por hoja en el medio de selección con el antibiótico espectinomicina durante la primera ronda de selección. (n= 10 hojas)

En la figura nº 2 se puede ver que la variedad 503 es la más precoz ya que en la segunda semana doblaba en número de yemas a todas las demás. En las dos semanas siguientes todas las variedades tuvieron un gran crecimiento parecido excepto BAJA que siguió con una media menor de 0,5 explantos y 503 que se comenzó a estabilizar. Durante las tres semanas posteriores; 503 se mantuvo por encima de las 5 yemas de media, 326 y PH variaron en una media entre 4 y 5 yemas y VIR e ITB entre tres y cuatro. La variedad BAJA siguió muy por debajo de las demás con un máximo de 1,37 yemas en su momento más alto.

Observando las curvas individualmente, se toma la variedad 503 como la más precoz, las variedades PH, VIR e ITB presentaron una curva de crecimiento similar, aunque PH obtuvo mayor número de yemas y las otras dos menores cantidades respectivamente. La curva de la variedad 326 tuvo el crecimiento más agudo, ya que consiguió casi multiplicar por cinco la media de yemas obtenida entre la cuarta semana, y la séptima. El crecimiento de la variedad BAJA representó una curva sin apenas

pendiente, estando muy por debajo de las demás variedades. También produjo problemas a la hora de pasar a la segunda ronda, debido a la dificultad de conseguir brotes con hojas desarrolladas.

Durante las últimas semanas hay una disminución general en el número de yemas debido a la muerte de algunas de ellas, exceptuando las variedades PH y 503. Esto se pudo deber a dos causas: falta de nutrientes en el medio o a que las yemas desarrolladas no estaban transformadas y finalmente murieron debido al antibiótico.

Durante la primera ronda de selección no es previsible obtener brotes homoplásmicos, ya que tras el bombardeo sólo un genoma plastidial está transformado. Con la presión de selección va aumentando el número de genomas transformados hasta que todos los plastidios de la célula se transformen, entonces se habrá conseguido la homoplasmia. Por ello se llevó a cabo una segunda ronda de selección en las mismas condiciones que la anterior, siendo los resultados mucho más productivos en número de yemas y homoplasmia. Estos nuevos brotes sirvieron más adelante para enraizar alguno de ellos y trasplantarlos a tierra.

Se determina el momento en el cual se pasan los regenerantes a segunda ronda de selección, cuando el número de los mismos sea suficiente. Esto fue surgiendo en fechas distintas para cada variedad. Para la variedad BAJA, en cambio, la fecha se determinó por la necesidad de utilizar los pocos regenerantes que se obtuvieron. (tabla 5).

Se observó que la mayoría de las variedades siguieron de cerca las pautas de la variedad control, situándose en el caso de 503 y VIR por delante de ella en precocidad (tabla 5), ITB con fechas similares y 326 por detrás pero en todos los casos se consideraron diferencias mínimas. La que más difirió en tiempo fue la variedad BAJA que prácticamente no llegó a los 10 regenerantes.



Variedades	<b>503</b>	<b>VIR</b>	<b>BAJA</b>	<b>326</b>	<b>PH</b>	<b>ITB</b>
<b>Fecha 10 reg.</b>	Semana 4	Semana 4	Semana 8	Semana 4	Semana 4	Semana 4
<b>Fecha 2ª ronda</b>	Semana 6	Semana 6	Semana 9	Semana 8	Semana 7	Semana 7

Tabla 5: Fecha de obtención de 10 regenerantes y 10 brotes válidos para pasar a segunda ronda de selección para cada una de las variedades estudiadas.

Variedades	<b>VIR</b>	<b>503</b>	<b>BAJA</b>	<b>326</b>	<b>PH</b>	<b>ITB</b>
<b>Crecimiento 1ª ronda</b>	Normal	Normal	Lento	Normal	Normal	Lento
<b>Crec. 2ª ronda</b>	Rápido	Rápido	Muy lento	Normal	Normal	Normal
<b>Crecimiento trasplante</b>	grande	grande	pequeño	Medio	Pequeño	pequeño

Tabla 6: Modo y aspecto del crecimiento de los brotes durante las rondas de selección y trasplante

El modo de crecimiento (tabla 6) de cada una de las variedades influyó en la duración del trabajo. Las variedades que presentaron crecimiento lento o muy lento retrasaron algunos de los aspectos aunque todo se llevó a cabo acorde con lo vaticinado en el cronograma inicial (tabla 4).

Durante todo el periodo de tratamiento de las plantas, hubo una variedad (VIR) que presentó síntomas de no estar transformada, teniendo la mayoría de las hojas blanqueadas a los pocos días de surgir las yemas. Esto produjo problemas a la hora de trabajar con las hojas y con las plántulas, debido a que la mayoría de las que se blanqueaban al poco tiempo morían.

A pesar de ello, utilizando hojas de brotes recién formados, se pudo disponer de la variedad durante todo el trabajo, además a partir del trasplante a tierra ese blanqueamiento desapareció dando unos de los mejores resultados en transformación.

### 5.3.-Enraizamiento

En la tabla nº 7 se presentan los porcentajes de enraizamiento de los brotes obtenidos tras la segunda ronda de selección y el éxito en el trasplante.

Variedades	503	VIR	BAJA	326	PH	ITB
<b>Plántulas iniciales</b>	12	12	10	12	12	12
<b>% enraizamiento</b>	100%	100%	91.66%	75%	100%	91,66%
<b>%Trasplante positivo</b>	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabla 7: Porcentaje de enraizamiento y éxito en el trasplante. En vertical las cinco variedades testadas y la control (PH).

El porcentaje de enraizamiento fue alto. Se disponía de varios brotes de cada variedad puestas en medio para el enraizamiento P3 con espectinomicina, exactamente doce de cada una, excepto en la variedad Baja, que debido a su dificultad para la regeneración únicamente se consiguieron obtener diez plántulas.

En la mayoría de las variedades ha habido un porcentaje de enraizamiento del 100%, es decir, para las variedades 503, PH y VIR. En el caso de BAJA e ITB, falló el enraizamiento en una de las plántulas (91,66 %), para ITB no supuso la pérdida de ninguna de las diez finales, pero en el caso de BAJA, debido a que inicialmente se disponía de diez, quedaron en nueve. En el caso de la variedad 326 de las doce iniciales no enraizaron tres dejando el porcentaje de enraizamiento en 75 % y las plantas finales en nueve.

El siguiente paso después de la formación de raíces ha sido el trasplante a tierra. Este ha dado muy buenos resultados como se ha podido observar en el seguimiento durante las tres semanas posteriores, ya que, no se ha contabilizado la pérdida de ninguna de las plantas. Esto quiere decir que el 100 % de las plántulas que enraizaron y se han pasado a sustrato de tierra ha sobrevivido al trasplante.

Hasta esta fase, se puede decir que las variedades que mejor han respondido tanto al enraizamiento como al trasplante han sido 503 y VIR. Las demás tienen unos porcentajes muy cercanos a los de estas, pero las más parecidas a la variedad control Petite Havana han sido las dos primeras.

#### ***5.4.-Análisis sobre el grado y porcentaje de transformación en las plantas.***

##### **5.4.1.- Expresión de GFP en plantas transplastómicas**

El grado de transformación de las plantas, se pudo llevar a cabo analizando la expresión del gen informador GFP que emite fluorescencia verde al iluminar la planta con luz ultravioleta (figura nº3y nº4). En las plantas no transformadas la clorofila emite fluorescencia rojo-granate.



Figura nº3: Hoja de plantas control (dcha.) y transplastomica (izda.) iluminadas con luz blanca (A) y ultravioleta (B). Plantas completas control (dcha.) y transplastomica (izda.), iluminadas con luz blanca (C) y ultravioleta (D).

Variedades	VIR	503	BAJA	326	PH	ITB
% T	80	70	88.8	77.77	60	50
% NT	20	10	11.11	11.11	20	20
% Q	0	20	0	11.11	20	30

Tabla 8: Porcentajes de transformación de las plantas utilizadas en el trabajo, dividido en variedades. Se han distinguido plantas transformadas (T), plantas no transformadas (NT) y plantas quiméricas (Q). Esta distinción se ha hecho en base a la fluorescencia de la GFP. (n=10-11 plantas/variedad)

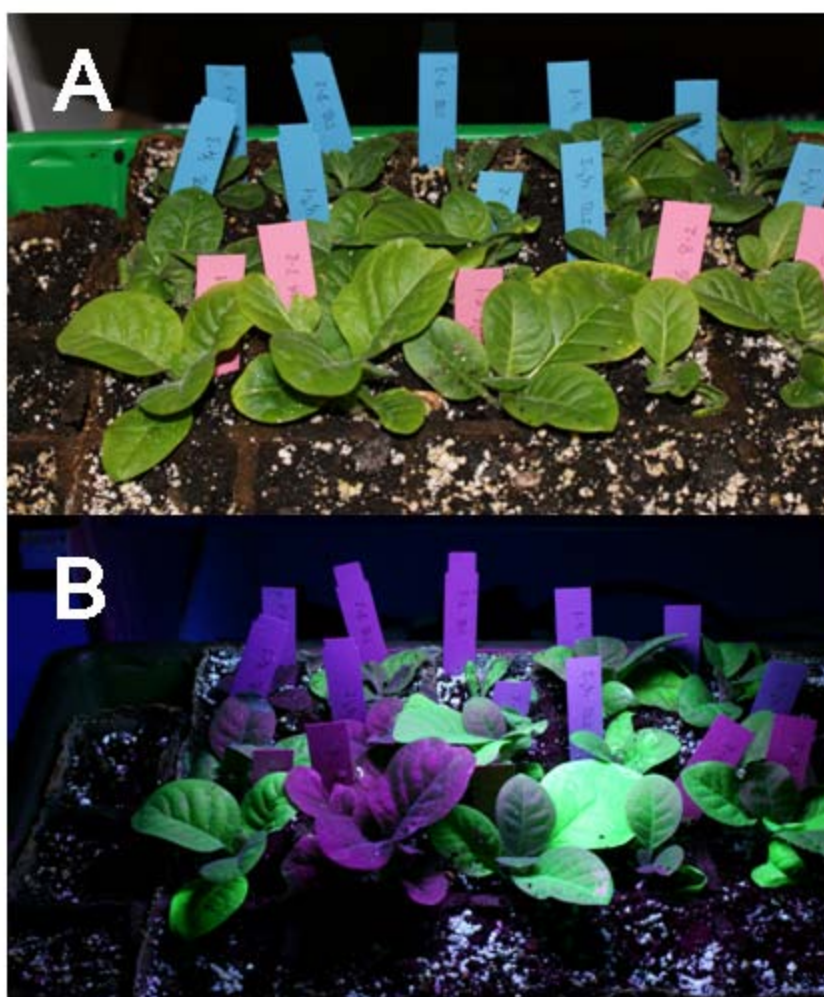


Figura 4: Bandeja de plantas bombardeadas de las variedades ITB y 326 bajo luz blanca (A) y ultravioleta (B).

Observando los porcentajes de transformación en la tabla nº 8, se puede ver que son bastante altos en la mayoría de las variedades. Lo más destacable es el 88,8 % de transformación en BAJA que supone el índice más alto, con un 0 % de plantas quiméricas, aunque los resultados obtenidos en la mayoría de parámetros para esta variedad han sido pésimos.

Le siguen con 80 %, 77,7 % y 70 % de transformación las variedades VIR, 326 y 503 respectivamente, siendo estas las que mejores resultados han dado a lo largo de todo el trabajo.

La variedad ITB presenta el porcentaje más bajo con únicamente el 50 % de transformación, y el resto divididas en 30 % de quiméricas y 20 % de no transformadas, quedando por debajo de la variedad control PH. Todos los demás resultados han sido superiores al 60 % de transformación de esta variedad.

La elección de las variedades más interesantes para llevar a cabo la comprobación de homoplasma, se realizó por descarte durante todo el trabajo con los resultados que se iban obteniendo a partir de las distintas fases. La variedad HAN fue la primera en descartarse, debido a una contaminación que arrastraba desde las semillas y que imposibilitó el trabajo en condiciones in vitro con ella. La siguiente variedad que se descartó fue la ITB por su escaso y tardío crecimiento durante la germinación, con una diferencia de una semana de retraso. Después se descartó BAJA al presentar una muy baja cantidad de regenerantes durante las rondas de selección, lo que la dejó muy por detrás de las demás variedades. Finalmente la variedad 326 fue la que menor porcentaje de enraizamiento dió con un 75 % que para tabaco, en un medio específico para ello, es bajo.

#### **5.4.2.- Comprobación de homoplasma mediante Southern Blot.**

Se escogieron las variedades VIR y 503 por ser las que mejores resultados dieron en el conjunto de las fases del trabajo. El proceso de Southern se llevó a cabo para verificar la homoplasma en los resultados.

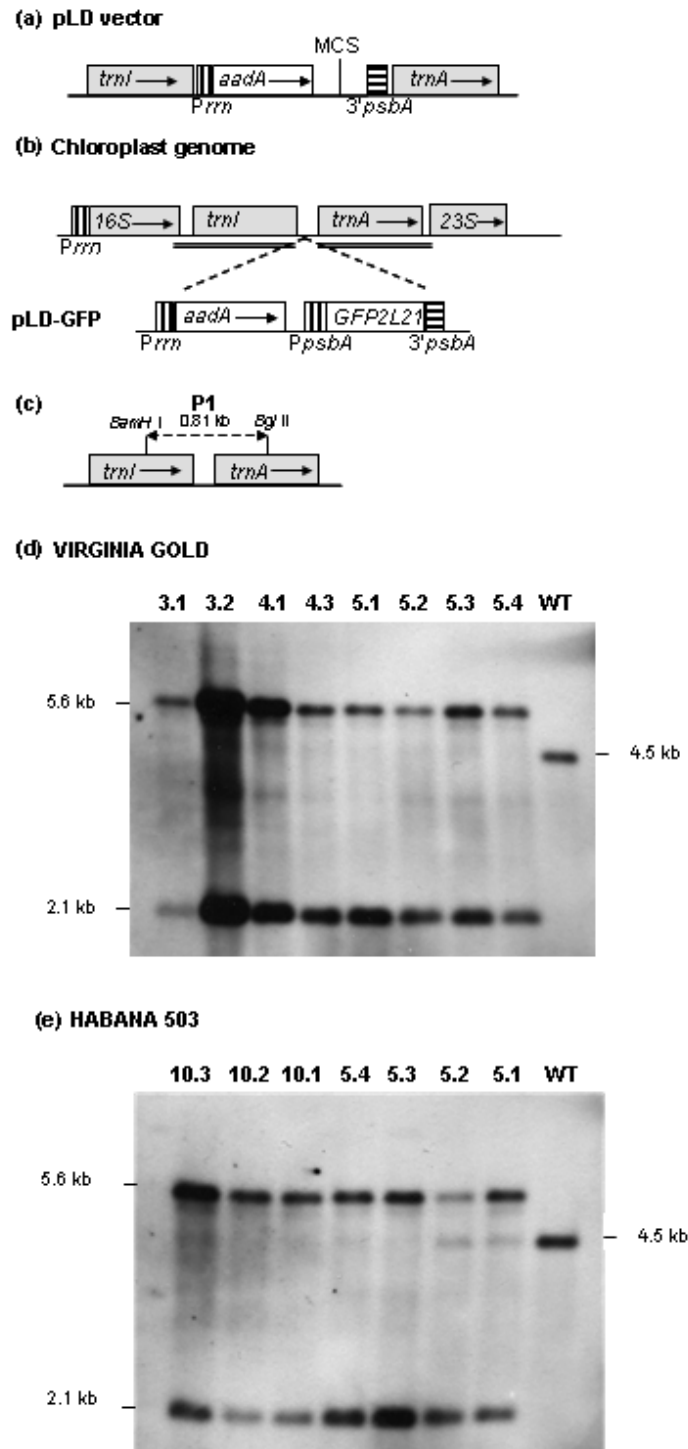


Figura 5. Construcción del vector e integración de los transgenes en el genoma plastidial. (a) Vector pLD con las zonas de recombinación homóloga *trnI* y *trnA*. (b) Genoma plastidial con las zonas de recombinación homóloga subrayadas. La fusión *GFP-2L21* está controlada por el promotor y terminador del gen plastidial *psbA*. Las flechas dentro de las cajas indican la dirección de transcripción. (c) El fragmento de 0,81 kb de la zona de recombinación homóloga utilizado como sonda en el análisis por Southern blot. (d, e) Análisis por Southern blot de 8 líneas independientes (variedad Virginia Gold) o 7 líneas independientes (variedad Habana 503). 2L21: secuencia incluida en el gen VP2 del parvovirus canino ; *aadA*: aminoglycoside 3'-adenyl transferase; GFP: proteína de fluorescencia verde; Prn: promotor 16S rRNA; WT: planta silvestre no transformada.

Partiendo de las hojas testadas mediante la GFP se esperaba similitud en los resultados positivos. El fragmento de 0,81 kb de la zona de recombinación homóloga se utilizó como sonda para testar la homoplasma. El ADN de la planta silvestre no transformada produjo un fragmento de 4,5 kb para las dos variedades (figura 5 (d,e)) que se comparó con los fragmentos producidos por las plantas transformadas. Estas generaron dos fragmentos de 5,6 y 2,1 kb correspondientes al vector introducido, en el caso de todas las hojas testadas para la variedad VIR y la mayoría de las hojas de la variedad 503. En las dos últimas hojas de la variedad 503, que se consideraban transformadas por la verificación mediante la GFP llevada a cabo anteriormente, se observaron los dos fragmentos correspondientes al vector introducido al igual que en las demás, pero con la diferencia de que a la altura de 4,5 kb se podía apreciar un tercer fragmento que delató la presencia del genoma de las plantas no transformadas, por lo que se consideraron heteroplásmicas.

## 6.- Conclusiones

- 1.- La germinación y el desarrollo in vitro fueron óptimos en las variedades 503, BAJA y 326. Las variedades HAN e ITB dieron problemas de contaminación desechándose la primera.
- 2.- La variedad 503 fue la más precoz y la que generó mayor número de yemas transformadas
- 3.- La eficiencia de transformación de las variedades 503, 326 e ITB fue la habitual para Petite Havana, variando entre 3,5-5,2 yemas transformadas por hoja bombardeada. La variedad BAJA presentó una eficiencia muy reducida en cuanto a brotes por hoja, ya que esta fue de 1,1.
- 4.- El crecimiento de las yemas transformadas de la variedad ITB fue lento y los brotes obtenidos fueron muy pequeños.
- 5.- Los brotes de la variedad VIR se amarilleaban durante el desarrollo in vitro. Las plántulas obtenidas recuperaron el fenotipo normal tras el trasplante.
- 6.- El enraizamiento en todas las variedades fue óptimo excepto para 326 que fue del 75%.
- 7.- El análisis de fluorescencia de la GFP mostró que el 88% de las plantas de variedad BAJA expresaban el transgén. Las variedades 503, VIR y 326 tenían porcentajes de expresión del 70-80%, superando el 60% de la variedad Petite Havana. La variedad ITB tuvo el porcentaje más bajo 50%.
- 8.- Teniendo en cuenta todos los parámetros estudiados las variedades Virginia Gold (VIR) y Havana 503- B (503) son las más adecuadas para la transformación plastidial siguiendo el protocolo establecido para la variedad Petite Havana.



## 7.- Bibliografía

- Bendich AJ.** (1987). Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? *Bioessays* 6, 279–82
- Bevan, M.W.,** Flavell R.B., and Chilton M.D. (1983). A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 304, 184-187.
- Bock R.** (2007). Plastid biotechnology: prospects for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 100-106
- Bogorad L.** (2000). Engineering chloroplasts: an alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products. *Trends Biotechnol.* 18, 257–263
- Chebolu S. and Daniell, H.** (2005). Chloroplast derived vaccine antigens and biopharmaceuticals: expression, folding, assembly and functionality. *Current Trends Microbiol. Immunol.*
- Daniell H.** Datta R, Varma S, Gray S, Lee S-B (1998). Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nat. Biotechnol.* 16, 345–348
- Daniell H.,** Lee, S.-B., Panchal, T., Wiebe, P. O. (2001). Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J. Mol. Biol.* 311, 1001.
- Daniell H.,** Muthkumar B. and Lee S. B. (2001). Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Curr. Genet.* 39, 109–116
- Daniell H.,** Khan M. S. and Alison L. (2002). Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci.* 7, 84–91
- Daniell H.,** Kumar, S., Dufourmantel, N. (2005). Breakthrough in chloroplast genetic engineering of agronomically important crops. *Trends Biotechnol.* 23, 238–245.
- Daniell H.** (2006). Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. *Biotechnology- Journal.* 1, 1071-1079.
- De Cosa B.,** Moar, W., Lee, S.-B., Miller, M., Daniell, H. (2001). Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat. Biotechnol.* 19, 71.

- DeGray G.**, Rajasekaran, K., Smith, F., Sanford, J., Daniell, H. (2001). Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiol.* 127, 852–862.
- Devine A.**, (2001). Oral administration of chloroplast-derived cholera toxin B-proinsulin fusion protein protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice. M.S. Thesis, University of Central Florida, Orlando.
- Devine A.**, (2005). Oral administration of chloroplast-derived cholera toxin B-proinsulin fusion protein protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice. M.S. Thesis, University of Central Florida, Orlando
- Dhingra A.**, Portis A. R. and Daniell H. (2004). Enhanced translation of a chloroplast expressed RbcS gene restores SSU levels and photosynthesis in nuclear antisense RbcS plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6315–6320.
- Dufourmantel N.**, Tissot G., Garçon F., Pelissier B. and Dubald M. (2004) Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant Mol. Biol.* 55, 479–489
- Fernandez-SanMillan A.**, Mingo-Castel A., Miller M. and Daniell H. (2003). Achloroplast transgenic approach to hyper-express and purify human serum albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotechnol. J.* 1, 71–79
- Fraley R.T.**, Rogers S.G., Horsch R.B., Sanders P.R., Flick J.S., Adams S.P., Bittner M.L., Brand L.A., Fink C.L., Fry J.S., Galluppi G.R., Goldberg S.B., Hoffmann N.L., and Woo S.C.. (1983). b. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80, 4803-4807.
- Gray B.N.**, Ahner B.A., Hanson M.R., (2009). High-Level Bacterial Cellulase Accumulation in Chloroplast-Transformed Tobacco Mediated by Downstream Box Fusions. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 102.
- Grevich J. J.**, Daniell, H. (2005). Chloroplast genetic engineering: recent advances and future perspectives. *Crit. Rev. Plant Sci.* 24, 83–107.
- Guda C.**, Lee S. B. and Daniell H. (2000) Stable expression of biodegradable protein based polymer in tobacco chloroplasts. *Plant Cell Rep.* 19, 257–262
- Hagemann R.** (2004) The sexual inheritance of plant organelles. In *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles* (Daniell, H. and Chase, C., eds), pp. 87–108
- Herrera-Estrella, L.**, Depicker A., van Montagu M., and Schell J.. (1983) Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303, 209-213.

- Iamtham S. and Day, A.** (2000) Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. *Nat. Biotechnol.* 18, 1172–1176
- Kamarajugadda S.,** Evaluation of immunogenicity and pathogen challenge of chloroplast malarial vaccine antigens. M.S. Thesis, University of Central Florida. Orlando 2006.
- Kota M., Daniell H., Varma S., Garczynski S. F., Gould F. and Moar W. J.** (1999) Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1840–1845
- Koya V., Moayeri, M., Leppla, S. H., Daniell, H.** (2005). Plant based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. *Infect. Immun.* 73, 8266–8274
- Kumar S., Dhingra A. and Daniell H.** (2004). Plastid expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol.* 136, 843–2854
- Lee S.B., Kwon H. B., Kwon S. J., Park S. C., Jeong M. J., Han S. E., Byun M. O. and Daniell H.** (2003). Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance. *Mol. Breed.* 11, 1–13
- Leelavathi S., Gupta n., Maiti S., Ghosh A. and Reddy V. S.** (2003). Overproduction of an alkali- and thermostable xylanase in tobacco chloroplasts and efficient recovery of the enzyme. *Mol. Breed.* 11, 59–67
- Leelavathi S. and Reddy, V.S.** (2003). Chloroplast expression of Histagged GUS-fusions: a general strategy to overproduce and purify foreign proteins using transplastomic plants as bioreactors. *Mol. Breed.* 11, 49–58
- Lossl A., Eibl C., Harloff H. L., Jung C. and Koop H. U.** (2003). Polyester in transplastomic tobacco: significant contents of polyhydroxybutyrate are associated with growth reduction. *Plant Cell Rep.* 21, 891–899
- Mayfield S.P., Franklin S. E. and R. A. Lerner** (2003). Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 438–442
- Maliga P.** (2004). Plastid Transformation In Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 289–313
- McBride, K.E.** Svab Z, Schaaf DJ, Hogan PS, Stalker DM, Maliga P (1995). Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Biotechnology* 13, 362–365

- McCabe M.S.**, M. Klaas, N. Gonzalez-Rabade, M. Poage, J.A. Badillo-Corona, F. Zhou, D. Karcher, R. Bock, J. C. Gray, P. J. Dix (2008). Plastid transformation of high-biomass tobacco variety Maryland Mammoth for production of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) p24 antigen. *Plant Biotechnology Journal* 6, 914–929
- Moll B**, Polsby L, Maliga P. (1990). Streptomycin and lincomycin resistances are selective plastid markers in cultured *Nicotiana* cells. *Mol. Gen. Genet.* 221, 245–50
- Molina A.**, Hervás- Stubbs S., Daniell H., Mingo-Castel A.M. And Veramendi J (2004). High yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnol. J.* 2, 141–153
- Murai N.**, D.W. Sutton, M.G. Murray, J.L. Slightom, D.J. Merlo, N.A. Reichert, C. Sengupta-Gopalan, C.A. Stock, R.F. Barker, J.D. Kemp, and T.C. Hall. (1983). Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors. *Science* 222, 476-482.
- Potrykus I.** (1991). Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 42, 205-225
- Ruf S.**, Hermann M., Berger I. J., Carrer H. and Bock R. (2001). Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat. Biotechnol.* 19, 870–875
- Ruiz O.N.** et al., (2003). Phytoremediation of organomercurial compounds via chloroplast genetic engineering. *Plant Physiol.* 132, 1344–1352
- Ruiz ON and Daniell H** (2005). Engineering cytoplasmic male sterility via the chloroplast genome by expression of {beta}-ketothiolase. *Plant Physiol* 138,1232-1246
- Sidorov V.A.**, Kasten D., Pang S.Z., Hajdukiewicz P.T.J., Staub J.M. And Nehra N.S. (1999). Technical advance: stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J.* 19, 209–216
- 244 Opinion TRENDS in Biotechnology Vol.23 No.5
- Sikdar S.R.**, Serino G., Chaudhuri S. and Maliga P. (1998) Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 18, 20–24
- Staub J. M.**, Garcia, B., Graves, J., Hajdukiewicz, P. T. et al., (2000). High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat. Biotechnol.* 18, 333–338.
- Svab Z**, Hajdukiewicz P, Maliga P. (1990). Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8526–30

- Svab Z.** and **Maliga P.** (1993). High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 913–17
- Thomas MR,** Rose RJ. (1983). Plastid number and plastid ultrastructural changes associated with tobacco mesophyll protoplast culture and plant regeneration. *Planta* 158, 329–38
- Tregoning J. S.,** Nixon, P., Kuroda, H., Svab, Z. et al., (2003). Expression of tetanus toxin fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res.* 31, 1174–1179.
- Watson J.,** Koya, V., Leppla, S. H., Daniell, H., (2004). Expression of *Bacillus anthracis* protective antigen in transgenic chloroplasts of tobacco, a non-food/feed crop. *Vaccine* 22, 4374–4384.
- Yan W.K.** and **Hunt, L.A.** (1999). Reanalysis of vernalization data of wheat and carrot. *Ann. Bot.* 84, 615–619
- Yu L.,** B. Gray, C. J. Rutzke, L. P. Walker, D.B. Wilson, M. R. Hanson, (2007). Expression of thermostable microbial cellulases in the chloroplasts of nicotine-free tobacco. *Journal of Biotechnology* 131, 362–369
- Zhang, Q.,** Liu Y. and Sodmergen (2003). Examination of the cytoplasmic DNA in male reproductive cells to determine the potential for cytoplasmic inheritance in 295 angiosperm species. *Plant Cell Physiol.* 44, 941–951
- Zhang, X.H.,** Windholm J.M. and Portis A.R. (2001). Photosynthetic properties of two different soybean suspension cultures. *J. Plant Physiol.* 158, 357–365